

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月24日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009~2012

課題番号：21249071

研究課題名（和文） 革新的な三次元培養装置を用いた血管化ヒト膵島再構成法の開発

研究課題名（英文） The generation of pancreatic beta-cell spheroids in a novel culture system

研究代表者

谷口英樹 (TANIGUCHI HIDEKI)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：70292555

研究成果の概要（和文）：

本研究では、膵β細胞による膵島組織の創出を目指し、模擬微小重力発生装置を応用した回転培地装置を用いて MIN6 細胞株から膵β細胞スフェロイドの大量創出技術を確立した。条件検討により任意のサイズの膵β細胞スフェロイドを多数創出可能な条件を見出した。得られた膵β細胞スフェロイドは2次元培養群と比較し、高いグルコース応答能、インスリン発現を示した。さらに、糖尿病モデルマウスへ移植した結果、持続的な血糖値下降効果が認められた。以上、本研究により、膵島移植に応用することの可能な血管化されたヒト膵島の創出に向けた細胞操作の基盤技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：

Islet transplantation can induce a substantial improvement in the treatment of type 1 diabetes mellitus (DM). However, the clinical application of islet transplantation is severely limited by the shortage of donor organs. We describe the generation of beta-cell spheroids using mouse insulinoma cells (MIN6) as a model of beta-cells. We established a 3D culture system that simulates microgravity using a 3D clinostat. Using this method, we were able to produce 100 spheroids per mL of culture media. The spheroids produced in the clinostat expressed several beta-cell signature genes at higher levels than the levels that were found in MIN6 cultured in a standard 2D culture dish (MIN6-2D). The transplantation of the spheroids into the DM mice ameliorates hyperglycemia, whereas the transplantation of the equivalent number of 2D-cultured cells failed to cure DM. These results indicate that the clinostat culture provides a new method for the reconstitution of a large number of functional beta-cell spheroids for DM treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2010年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2011年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2012年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
年度			
総計	35,900,000	10,770,000	46,670,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：幹細胞・iPS細胞・糖尿病・膵島移植・三次元培養

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の患者数は全世界で推定 3 億 3600 万人といわれ増加の一途をたどり、死亡者は毎年 460 万人にのぼる(国際糖尿病連合 2011 年)。1 型糖尿病はインスリンを産生する β 細胞が破壊され血糖の制御できず高血糖状態に陥る疾患で、さまざまな合併症を引き起こされる。従来、生涯にわたって毎日数回のインスリン自己注射を続ける治療が必須であったが、近年、健常者の膵臓から膵島のみを分離し、患者の門脈内に移植する膵島移植が開発され、良好な臨床成績をあげてきている。しかしながら、慢性的なドナー不足が問題となっていることから、胚性幹細胞(ES 細胞)や人工多能性幹細胞(iPS 細胞)を用いた膵 β 細胞の再生医学的な創出が盛んに試みられており、成果を上げてきている。創出された膵 β 細胞を臨床応用へ用いるためには、人為的に膵 β 細胞から膵島を構築する細胞操作技を開発することが急務である。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではマウス膵 β 細胞株(Mouse Insulinoma cell line6: MIN6)をモデル細胞として用い、人工膵島の大量創出を試みた。これまでに、三次元培養法による膵島様組織である膵 β スフェロイドの創出が報告されているが、ヒトでの移植に必要とされている数量(約 1 万個)を、移

植効果の高いサイズ(100–250 μ m)で創出するには至っていない。そこで、我々は膵臓の器官発生の際に膵 β 細胞などの各種膵内分泌細胞が分散状態から凝集して膵島を形成する点に着目した。この状態を in vitro で再現するためには細胞の位置関係が中立である外部環境が重要であると考え、模擬微小重力発生装置(クリノスタット)を採用した新しい三次元培養技術の開発を試みた。

(2)血管内皮細胞および間葉系細胞は、成体組織を維持するために機能的な血管網を構成するのみならず、正常臓器の形成において重要な役割を担うことが示唆されており、膵前駆細胞の分化や増殖を制御する上で極めて重要な細胞間相互作用を発揮する。さらに、成体の膵島組織においても、膵 β 細胞の機能発揮において、これらの細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。そのため、膵 β 細胞に加えて、膵臓の発生過程や膵 β 細胞の増殖などに関わる血管内皮細胞、血管構造の長期安定化に必要な壁細胞に分化可能な間葉系幹細胞という 3 種類の異なった細胞を用いてヒト血管網を有した 3 次元組織の創出を行い、移植による膵島様組織の成熟化を試みた。

3. 研究の方法

(1) クリノスタットによる三次元培養

三菱重工業株式会社(MHI)製クリノスタットを用いて細胞の三次元培養を行った。クリノスタットの運転条件は、平均重力レベルを $1 \times 10^{-2} G$ 以下、重力分散値を X 軸、Y 軸、Z 軸のいずれも 0.333 となるように設定した。この軌道制御設定により、運転中の X 軸、Y 軸および Z 軸の平均重力(G)値はそれぞれ、 $-0.000G$ 、 $-0.001G$ および $-0.000G$ となった。培養中の気相は O_2 約 40%、 CO_2 5% とし、培養温度は $37^\circ C$ とした。I 型糖尿病モデルマウスの作製は、C57BL/6J マウス(日本チャールズリバー)6 週齢(♂)を使用して実験を実施した。尚、すべての実験は横浜市立大学医学部動物センターの規定に基づき、本大学が定める倫理規定を遵守して施行した。I 型糖尿病モデルマウスはストレプトゾトシン (以下 STZ) を投与し、3 日間にわたり連続して空腹時血糖値が 300mg/dL 以上に達したマウスを糖尿病モデルマウスと認定した。

(2) EGFP で標識した正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Normal Human Umbilical Vein Endothelial Cell: HUVEC) (EGFP-HUVEC), KO で標識した膵 β 細胞 (KO-MIN6) を 1.0×10^6 個、ヒト間葉系幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cell: hMSC) を 1.0×10^5 個の細胞数で混合し共培養培地で懸濁し、固化したゲル上に 24 ウェルプレートに 1 ウェル毎に細胞懸濁液を播種し、3 日間培養することで血管網を有する 3 次元組織を作成した。継続観察用 Cranial Window (CW) マウスの作製は、主に Koike らの方法 (Nature 2004) に従って行った。CW へ移植した 3 次元組織は共焦点顕微鏡を用いて血管網や形態変化を経時的に観察した。

4. 研究成果

(1) 模擬微小重力発生装置を用いた三次元培

養法による膵 β 細胞スフェロイドの大量創出

膵 β 細胞スフェロイド形成に最適な培養日数を検討したところ、クリノスタット培養装置を用い MIN6 を 4 日間培養することで、膵 β スフェロイドを効率よく形成可能な条件を見出した。特に 6×10^6 , 7×10^6 cells/mL では、従来よりも大幅に多い 1000 個以上の膵 β 細胞スフェロイドが創出された。細胞密度を増加させると、 $100-250 \mu m$ のサイズを有する膵 β 細胞スフェロイドの存在比率も増大した。これらの膵 β 細胞スフェロイドは膵島と類似した構造を有していることが判明し、膵 β 細胞特異的タンパク質であるインスリンや C-ペプチドを発現することが確認された。遺伝子発現解析により測定した β 細胞関連遺伝子のほとんどにおいて、スフェロイドでは静置培養群と比較して発現強度が増していた。グルコース応答性を測定したところ、グルコース刺激に応答したインスリン分泌が確認された。以上のことから、クリノスタットによる三次元培養法で既存の方法よりも格段に多数の膵 β 細胞スフェロイドを創出できることが分かり、サイズ制御も可能であることが分かった。また、スフェロイド形成させる三次元培養は、静置培養と比較して機能的な側面から優れていることが示唆された。

作製した膵 β 細胞スフェロイドによる治療効果を検討するため、糖尿病モデルマウスへの門脈内移植を実施した。すると、移植直後から、空腹時血糖が大幅に低下し高血糖状態が改善することが判明した。また、移植 24 日後までの持続的な血糖効果作用も確認された。組織学的解析により、移植部位である肝臓内に移植した膵 β 細胞スフェロイドが生着していることが確認された。

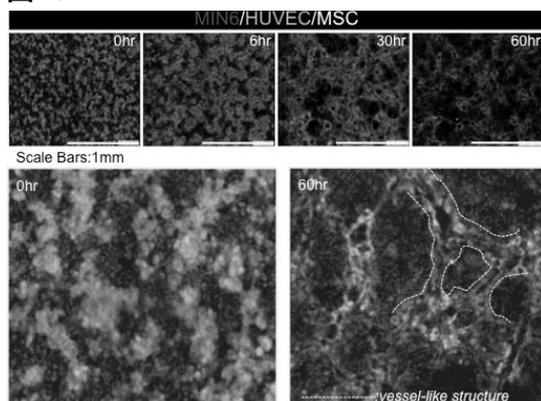
以上の結果より、クリノスタットにより創出された膵 β 細胞スフェロイドは、移植後も生着することが可能であり、かつ、in vivo においても機能的であることが確認された。今後、安全性の高いヒト膵 β 細胞株、もしくは iPS 細胞からヒト膵 β 細胞への分化誘導技術が確立できれば、本法のような革新的な三次元培養技術と組み合わせることで、移植効果

の高いヒト膵島様組織を大量に創出することが出来ることが期待される。

(2) 膵β細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞の共培養による血管網を有する3次元組織の創出

マトリゲル上にマウス膵β細胞株(MIN6)、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、ヒト間葉系幹細胞(hMSC)を混合し播種した。すると、培養24時間後には、3次元組織を構築した。また、3次元組織内部において、細胞の形態変化を追跡するため、蛍光標識した細胞を用いて共培養を行った。HUVECにgreen fluorescent protein(GFP)を、MIN6にKusabira Orange(KO)をそれぞれ導入し、共焦点顕微鏡で細胞形態を観察したところ、培養開始後30時間には、HUVECによる網目構造の中心部が管腔構造を構築し、MIN6は、球状に集合しスフェロイドを形成していた(図1)。以上のことから、MIN6、HUVEC、MSCを共培養することで創出された3次元組織は、血管網を伴った3次元組織であることが示された。

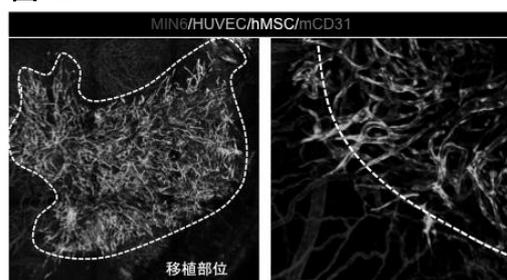
図 1



次に、創出された血管網を有する3次元組織を移植し、細胞の形態変化を追跡した。頭部観察窓(CW)マウスに移植を行い、形態変化を追跡すると共培養による血管網を有する3次元組織の移植では、移植後2日目には宿主側から血液灌流が入り始めていた。移植後3~4日目には、移植箇所全体に対して血液灌流が行われ

ていた(図2)。

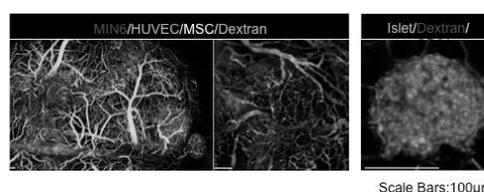
図 2



また、MIN6と血管内皮細胞の形態変化を観察したところ、共培養移植ではMIN6が増殖し、周辺に存在していたヒト血管内皮細胞由来の血管網を内部に取り込んだ球状組織に成熟していた。次に、宿主側血管の可視化を行ったところ、共培養移植では、移植後4日目にヒト血管内皮細胞由来の血管網が宿主側のマウス血管と吻合することが確認された。

正常膵島組織は、膵β細胞を含むいくつかの細胞によって構成され球状の組織を構築しており、膵島組織の内部に血管網を含んでいる。成熟した球状組織と、正常膵島組織との近似性を比較したところ、移植により得られた球状組織は血管内皮細胞由来の血管網を内部に含んでおり、その存在比率が膵島組織に比較的近いことが示唆された(図3)。これらの結果、移植後に成熟した球状組織は、正常膵島組織と近似した膵島様組織であることが明らかとなった。

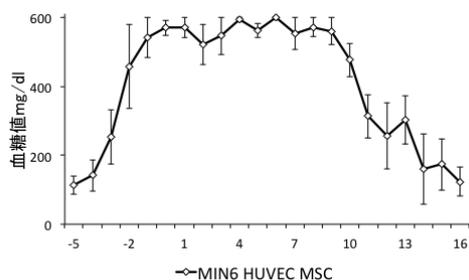
図3



次に、ヒト血管網を有する3次元組織を糖尿病モデルマウスへ移植し、その治療効果を検証した。腎皮膜下に移植を行ったところ、移植組織が生着し、立体的な組織を構築することが判明した。免疫組織学的解析により、創出された組織はCWに移植し創出された膵島様組織と同様

に、Laminin などの基底膜成分や Insulin を内部に発現することが確認された。血糖値は移植後 14 日目以降に 300mg/dl 以下に低下し、以降 300mg/dl 以下を維持した。これらの結果から、ヒト血管網を有する膵島様移植による糖尿病の治療効果が確認された(図4)。今後、前述した膵β細胞スフェロイドの大量作成技術と組み合わせることにより、効率的なヒト血管網を有する膵島様組織の大量作成法が開発されることが期待できる。(図4)。

図 4



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Taniguchi H: Vascularized and functional human liver tissue from an induced pluripotent stem cell-derived organ bud transplant. *Nature* in press・査読有 10.1038/nature12271
2. Tanaka H, Tanaka S, Sekine K, Kita S, Okamura A, Takebe T, Zheng YW, Ueno Y, Tanaka J, Taniguchi H: The generation of pancreatic β-cell spheroids in a simulated microgravity culture system. *Biomaterials* 34:5785-91, 2013 査読有 10.1016/j.biomaterials.2013.04.003
3. Koike H, Kubota K, Sekine K, Takebe T,

Ouchi R, Zheng YW, Ueno Y, Tanigawa N, Taniguchi H: Establishment of Automated Culture System for Murine Induced Pluripotent Stem Cells. *BMC Biotechnology* 12:81, 2012 査読有 10.1186/1472-6750-12-81.

4. Takebe T, Sekine K, Suzuki Y, Enomura M, Tanaka S, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H: Self-organization of human hepatic organoid by recapitulating organogenesis in vitro. *Transplant Proc* 44(4):1018-20, 2012 査読有 10.1016/j.transproceed.2012.02.007
5. Sekine K, Takebe T, Enomura M, Matsui C, Tanaka H, Taniguchi H: Regenerative medicine approach as an alternative treatment to islet transplantation. *Transplant Proc* 44(4):1104-6, 2012 査読有 10.1016/j.transproceed.2012.03.020

[学会発表] (計 111 件)

1. 谷口英樹. 武部貴則. 関根圭輔: 如何にして器官発生を模倣するのか?—血管系を有するヒト肝組織創出法の開発— 第12回日本再生医療学会 パネルディスカッション Mar. 21-23, 2013 パシフィコ横浜 (神奈川県)
2. 奥田諒. 孫略. 関根圭輔. 松井智栄美. 坪井康次. 谷口英樹: 膵癌モデルマウスを用いた膵癌幹細胞の細胞系譜解析 第12回日本再生医療学会 口演 Mar. 21-23, 2013 パシフィコ横浜 (神奈川県)
3. 江野村允宏. 武部貴則. 高橋禎暢. 田中博康. 小池直人. 関根圭輔. 谷口英樹: ヒト微小血管網を有する膵島様組織の創出 第12回日本再生医療学会 ポスター Mar. 21-23, 2013 パシフィコ横浜 (神奈川県)

- 川県)
4. 谷口英樹 : iPS 細胞からヒト臓器を作る！—薬剤評価系への波及効果— 日本動物実験代替法学会第 25 回大会 口頭 Dec. 7-9, 2012 慶應義塾大学薬学部 芝共立キャンパス (神奈川県)
 5. Enomura M, Takebe T, Sekine K, Koike N, Taniguchi H, Tanaka H: Generation of islet like structures with human functional vascular networks. International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting. パシフィコ横浜 (神奈川県), Jun 13-16, 2012
 6. Zheng Y, Li B, Zhang R, Kimura M, Tsuchida T, Takebe T, Ueno Y, Sekine K, Taniguchi H: Self-renewal versus differentiation as well as the liver repopulation capability of human hepatic stem cells. International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting. パシフィコ横浜 (神奈川県), Jun 13-16, 2012
 7. Sekine K, Ishikawa M, Takebe T, Suzuki A, Kawashimo K, Matsui C, Taniguchi H: Identification of pancreatic stem/progenitor cells expressing PDX1 reside in the CD133 positive pancreatic duct. International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting. パシフィコ横浜 (神奈川県), Jun 13-16, 2012
 8. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Suzuki Y, Koike H, Zhang R, Koike N, Ueno Y, Zheng Y, Taniguchi H: Creation of vascularized human organ from induced pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting. パシフィコ横浜 (神奈川県), Jun 13-16, 2012

[図書] (計 4 件)

1. 谷口英樹 : 膵島細胞の機能制御・分化誘導 再生医療叢書 5 代謝系臓器 朝倉書店 2012:24-33
2. 谷口英樹, 大島祐二, 喜多清 : iPS 細胞の糖尿病治療への応用—現状と課題— *iPS 細胞の産業的応用技術* シーエムシー出版 2009 : 202-210
3. 谷口英樹 : 肝臓 炎症・再生医学事典 朝倉書店 2009:470-472
4. 谷口英樹 : 創薬プロセスの加速化に向けたヒト幹細胞の産業利用 *幹細胞の分化誘導と応用—ES 細胞・iPS 細胞・体性幹細胞研究最前線* 株式会社エヌ・ティー・エス 2009 : 379-389

[その他]
総説 25 件

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~sais/ei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 英樹 (TANIGUCHI HIDEKI)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 70292555

(2) 研究分担者

小池 直人 (KOIKE NAOTO)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号 : 50301081

上野康晴 (UENO YASUHARU)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号 : 60375235

鄭 允文 (YUN-WEN ZHENG)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号 : 80404995